

Title	〔第1篇〕ウサギの Alveolar Macrophage 抽出液中に存在する伝達因子の精製(ツベルクリン感受性伝達因子の化学的性状に関する研究)
Author(s)	岡田, 長保
Citation	京都大學結核研究所紀要 (1966), 14(2): 130-139
Issue Date	1966-03
URL	http://hdl.handle.net/2433/51814
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	publisher

ツベルクリン感受性伝達因子の化学的性状 に関する研究

〔第1篇〕 ウサギの Alveolar Macrophage 抽出液中に 存在する伝達因子の精製

京大結研 病態生理学部 (主任 辻 周介 教授)

岡 田 長 保

緒 言

ツベルクリン感受性の伝達(1)を始め、種々の遅延型アレルギー(2)(3)を感作動物から正常動物へ受身伝達するには、感作動物由来の生きた細胞を用いることが必須の条件とされ、破壊した細胞材料、或いは血清によっては、不可能であると考えられて来た(4)。然るに、1955年Lawrence(5)が、ヒトの末梢血白血球を破壊して作製した抽出液を用い、ツベルクリン感受性を含む各種の遅延型アレルギーの受身伝達に成功して以来、細胞抽出成分による伝達はヒトに関する限り可能と見なされるに至った。Lawrenceが分離した“Transfer factor”は、比較的安定な物質であり、37°C、6時間の加温、或いは凍結融解操作によっても破壊されず、蛋白分解酵素、DNase, RNaseによってもその活性を失わないことが証明された(6)。更に、1963年、Lawrenceら(7)は、DNase処理を施した白血球抽出液をセロファン膜を用いて透析し、その透析外液成分にも伝達因子が存在することを報告した。一方、Baramら(8)も、ヒトの感作細胞抽出液をカラムクロマトグラフィーによって分割し、Transfer factorを含む分割について免疫電気泳動による同定実験を行った。かくの如く、ヒトにTransfer factorの存することはまず確実なのに拘らず、動物を用いての従来の実験がいずれも否定的な結果に終わっていたことは、むしろ生物学上の謎とも云えよう。1964年、

辻ら(9)はこの疑問を解明するため、BCG死菌感作後同じくBCG死菌を静注する所謂challengeを加えたウサギのalveolar macrophageより、一定の抽出分割を得、これを用いてツベルクリンアレルギーの受身伝達に成功したと報告し、従来の動物実験における不成功は、Transfer factorにinhibitorが混在しておったためであろうと推論した。

著者はこれらの事実の上に立って、BCG死菌による感作及びchallengeを行ったウサギalveolar macrophage抽出液を、カラムクロマトグラフィーや電気泳動により分割してTransfer factorの精製を行い、その免疫化学的、乃至物理化学的性状を明かにし得たので、以下これについて報告する。

実験材料及び実験方法

実験動物：体重2~3kgの市販白色成熟ウサギ(雌雄)を用いた。recipientとして用いた動物は、使用1週間前、5倍稀釈及び10倍稀釈旧ツベルクリン液(以下1:5 O.T., 1:10 O.T.と略記)を剃毛せる側腹部皮内に注射し、5時間、24時間、48時間目に於て全く無反応であるもののみを使用した。尚、本実験に於て使用したO.T.はすべて国立予防衛生研究所より供与を受けたものである。

Donor ウサギの感作方法：Myrvikらの方法(10)に従い、BCG加熱死菌50mg(乾燥重量)を生理的食塩水0.5mlに浮游させ、流動パラフィン1ml、ラノリン0.5mlと混合攪拌し、これを二分して1ml宛ウサギの両側大腿部皮下に注射した。感作後、3~4週目に

ツベルクリン皮内反応 (1:10 O.T.) は発赤径 20mm 以上の陽性を示した。この動物に BCG 加熱死菌 5mg を生理的食塩水 1ml に浮遊させて耳静脈より注射した (以後、この処置を challenge と呼ぶ)。尚、これらの処置 ウサギを V.C. ウサギと略称することにする。

Alveolar macrophage の採集及び細胞破壊抽出液

作製法: 感作後 challenge 処置を加えて4日目のウサギを頸動脈より採血致死せしめ、Myrvik らの方法に従い気管分岐部上方 2~3cm より切断して気管と共に肺臓を取出した。気管より Hanks 液を用いて肺胞内の alveolar macrophage を洗い出し、1000rpm, 20分間、遠心操作を3回反復して packed cell を得、これを定量した。かくして採集した alveolar macrophage はウサギ一羽より 1.0~5.0ml であり、その 1ml 中には $3\sim6\times10^8$ コの細胞を含んでいた。その 80~90% は大単核細胞であり、10~20% が小リンパ球及びその他の細胞であった。packed cell 1 容の alveolar macrophage を4容の蒸溜水に浮遊させて後、凍結融解操作を5回反復して細胞膜を破壊し、20,000G, 90分間、冷却遠心分離を行なった後、その遠心上清を細胞破壊抽出液として実験に用いた。以下に述べる分割操作及び伝達実験に用いた細胞抽出液は、その都度 donor ウサギ10羽分以上プールした材料である。それらは使用迄 -20°C に保存した。

受身伝達実験方法: 細胞抽出液の分割操作によって得られた実験材料の recipient に対する投与は、凡て静脈内投与法によった。静脈内投与後、即時、1日目、3日目、7日目に、1:10 O.T. を剃毛せる側腹部皮内に注射し、注射後5時間、24時間及び48時間目に局所反応を観察し、以下に述べる判定規準に従って各時間における皮膚反応の状態を記録した。

- ++ : 硬結を伴う明瞭な発赤 (径 10mm 以上) が認められたもの。
- +
- ± : 弱い発赤が認められるが、毛細血管の拡張などを含み、+ と - の区別が困難なもの。
- : 全く反応の認められない場合。

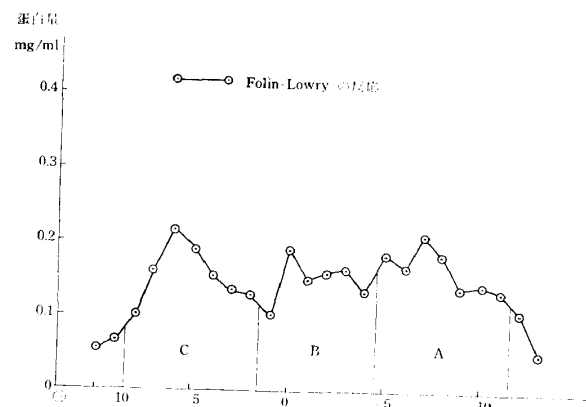
以下に記載する表中の反応経過は、各テスト日に於ける5時間目、24時間目、48時間目の皮膚反応を、上記の判定規準に従って記載し、() の中に発赤径を示したものである。

細胞抽出液の分割法:

- 1) 澱粉カラムによる分域電気泳動。

Kunkel の方法(11)に従い、 $5\text{cm}\times2\text{cm}\times50\text{cm}$ の澱粉カラムで veronal acetate buffer ($\text{PH}8.6$, $\mu=0.05$) を用い、 $2\text{mA}/\text{cm}^2$, 350V で32時間泳動した。細胞抽出液は pervaporation により濃縮した後、 $\text{PH}8.6$ veronal buffer に対して12時間透析し、一回の泳動には packed cell 10ml 相当量の抽出液 (約7.5 ml) を用いた。泳動終了後、カラムを 1cm 巾に分割、各分割を夫々 10ml の生理的食塩水にて12時間、 4°C で抽出し、その遠心上清について Lowry の方法(12)により蛋白量を測定した。第1図の如く A, B, C 3分割にプールし、pervaporation により濃縮後、生理的食塩水に対して透析し、その内液上清を受身伝達実験に用いた。

図1 V.C. ウサギ Alveolar Macrophage 抽出液の澱粉カラム分域電気泳動による分割



2) Sephadex G-200 gel filtration:

本分割操作は $4^{\circ}\text{C}\sim6^{\circ}\text{C}$ の恒温室内で行なった。Sephadex G-200 粉末 (particle size $40\sim120\mu$, water regain $20\pm2\text{g. water/g. dry gel}$, Pharmacia Uppsala) を充分量の蒸溜水で膨潤、洗滌後、 $\text{PH}7.4$, 0.075M phosphate buffered saline (0.15M NaCl, 0.001M Di-sodium Ethylene diamine tetraacetate (EDTA) を含む——以後、本緩衝液を PBS-EDTA と略称)) で頻回洗滌し、直径 6.5cm, 高さ 50cm のカラムに充填した。凍結乾燥法により5倍濃度迄濃縮後、9,000rpm, 15分間遠心した細胞抽出液上清 10 ml (packed cell 10ml に相当) をカラムに注入し、PBS-EDTA により $15\text{ml}\sim20\text{ml}/\text{hr}$ の速度で溶出を行ない、12ml 宛フラクションコレクターにより採取した。蛋白量測定は、Beckman DU 分光光度計による $280\text{m}\mu$ における紫外線吸光度及び Lowry の方法によった。後者は、溶出液 0.5ml について行ない、ウサギ γ -globulin fraction II (Nutritional Biochemicals Corporation) を標準として用いた。

図2 V.C. ウサギ Alveolar Macrophage 抽出液の Sephadex G-200 Gel Filtration による分割

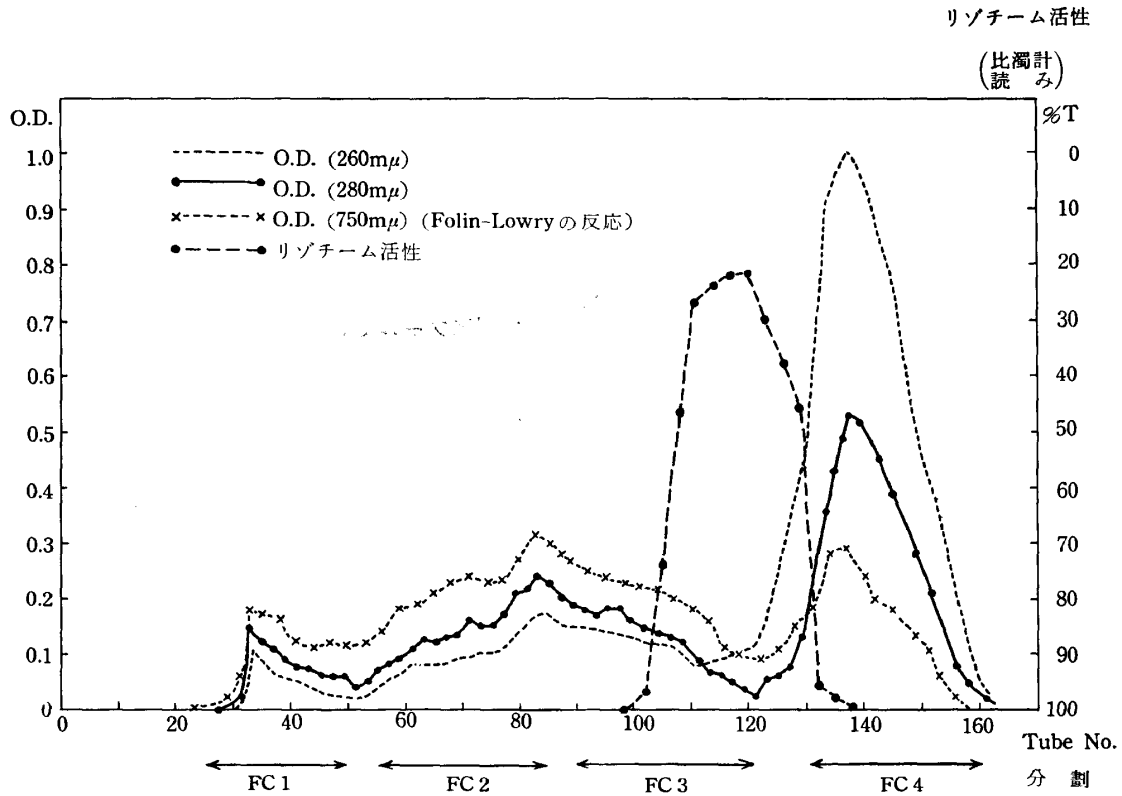


図2に示す如く，溶出液を FC₁, FC₂, FC₃, FC₄ の4分割に分割プールし，夫々 10ml 迄凍結乾燥法により濃縮後，FC₁, FC₂ は100倍量の PBS-EDTA に対して24時間透析を行ない (No.32 セロフエンチューブ：Visking Company, U.S.A.)，その透析内液上清を受身伝達実験に用いた。FC₃ の一部及び FC₄ は，比較的low分子成分であるため，濃縮後，以下に記載する Sephadex G-25 を用いて PBS-EDTA 等張となし，その分割を伝達実験材料とした。

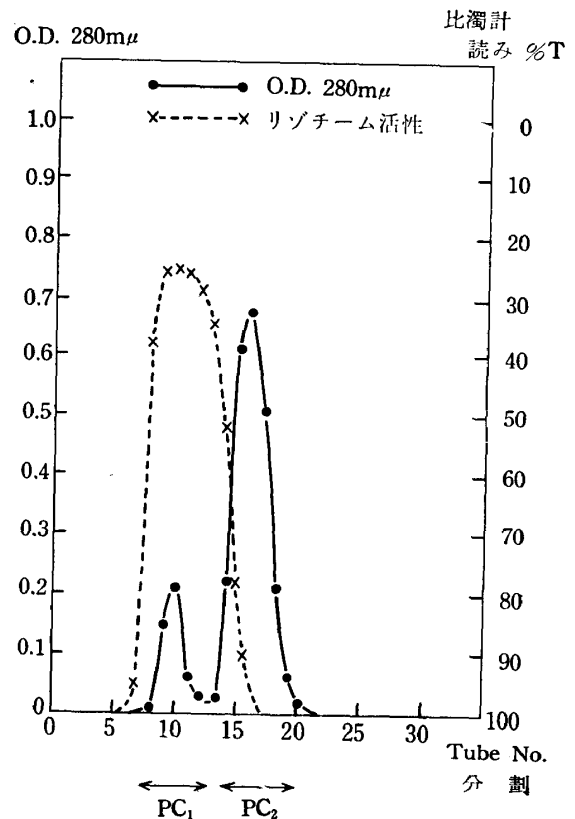
3) Sephadex G-25 gel filtration :

Sephadex G-25 粉末 (particle size 20~80 μ , water regain 2.5 \pm 0.2g. water/g. dry gel, Pharmacia Uppsala) を蒸留水で洗滌後，PBS-EDTA で平衡せしめ，直径 4.5cm，高さ 15.0cm のカラムに充填した。前記濃縮 FC₃, FC₄ の 3ml (packed cell 3ml に相当) を用いて gel filtration を行ない，7ml 宛の分割に採取し，図3の如く PC₁, PC₂ の2分割に分割し，PBS-EDTA 等張となして伝達実験材料とした。

4) 細胞破壊抽出液の透析分割作製法：

細胞破壊抽出液をセロフエンチューブに入れ，100倍量の蒸留水に対して 4°C，48時間透析操作を行なっ

図3 FC₃ の Sephadex G-25 による細分割



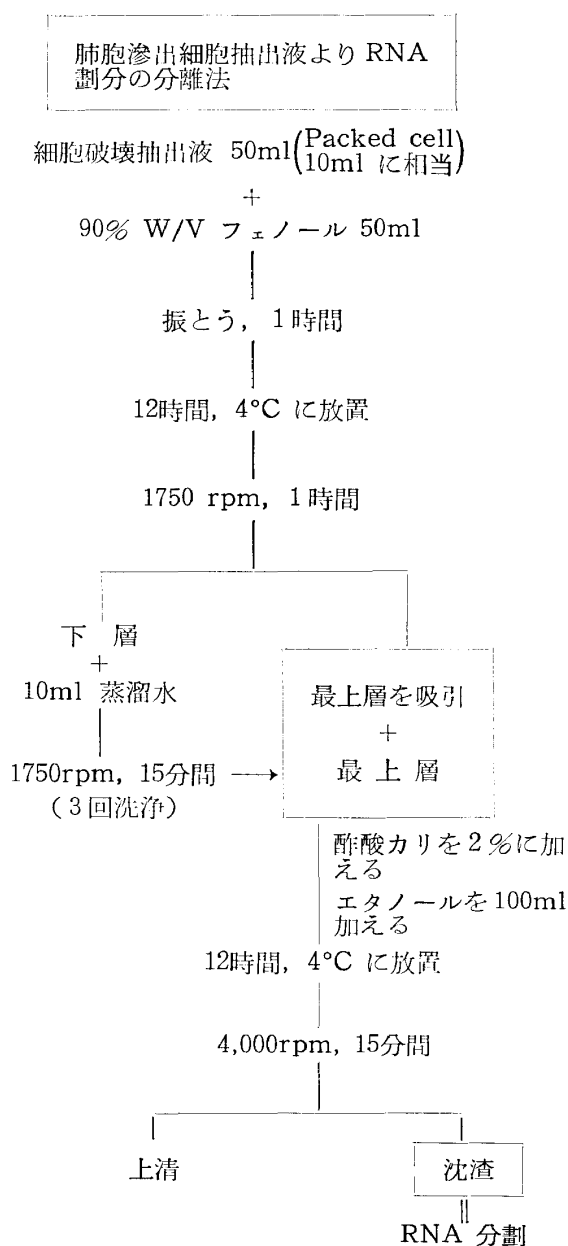
た。この間24時間目に一回外液の交換を行ない、外液はプールして透析前の容量迄凍結乾燥濃縮し、以後の伝達実験に用いた。内液は 9000rpm, 15分間の遠心操作によって、水可溶性部分と不溶性部分とに分別し、その上清を原 packed cell 容量迄濃縮した後、Sephadex G-200 gel filtration を行なった。

5) RNA 劃分の抽出法：

細胞破壊抽出液から図4に示す方法(13)によってRNA劃分を抽出し、生理的食塩水に溶解して受身伝達実験に用いた。その定量法としては ribose を対照として orcinol 反応(14)を行ない、pentose の定量を行なった。

FC₃ の沈降係数測定：

図 4



細胞抽出液の Sephadex G-200 カラム操作により得られた FC₃ を蒸溜水に対して24時間透析後、その蛋白濃度が0.3%となる様調整し、0.15M NaCl 溶液として 6.18°C にて測定した。スピスコ E 型超遠心機 (Beckman Instruments Corp.) を用い、59,780rpm にてシュリーレン法により 8 分毎に10枚撮影した (京都大学ウイルス研究所, 化学部)。然る後、沈降係数 S_{20, w} の計算(15)を行なった。

リゾチーム活性定量法：

細胞抽出液の Sephadex G-200 gel filtration により得られた溶出液について、リゾチーム活性分布を次の如くして測定した(16)。普通斜面寒天培地に 37°C, 24時間培養した *Sarcina lutea* を PH6.5, 1/60M 燐酸緩衝生理食塩水に浮遊させ、Coleman 比濁計を用いて略 250 Unit となる様、菌量を調整した後、溶出液 1ml に対して菌液 5ml を加え、37°C, 1時間、水浴中に放置して比濁計にてその濁度を測定した。リゾチーム活性分布曲線は比濁計の %T にて表現したが、絶対値の測定には卵白リゾチーム結晶 (Pentex Incorporation) を標準として用い、μg/ml の活性にて表現した。

Cellulose acetate 膜を支持体とする電気泳動：

1.5cm × 5.5cm の cellulose acetate 膜 (Separax, 富士写真フイルム株式会社, 東京) を使用し、小川の記載した所(17)に従い、PH8.6, 0.075M veronal buffer を用いて、0.7mA/cm, 40分間泳動した。泳動試料は FC₃ (蛋白量 3mg/ml) で 0.004ml/cm を塗布して行なった。

実験成績

第1節 Gel filtration による劃分実験：

図2は細胞抽出液 10ml (packed cell 10ml 相当量) を Sephadex G-200 カラムにより劃分した実験成績を示すものである。即ち、図2の如く FC₁, FC₂, FC₃ 及び FC₄ の4劃分を得た。これら4劃分は夫々 Flodin ら(18)の方法に従って血清蛋白成分の分布と比較対照した結果、その分子量の大きさでは FC₁ は血清の 19S macroglobulin 劃分, FC₂ は 7S γ-globulin 及び Albumin 劃分に相当し, FC₃ はリゾチーム及びこれよりやや分子量の大きい蛋白質を含む劃分, FC₄ は FC₃ よりも更に小さい分子量を有する物質を含む劃分であった。Myrvik ら(19)(20)は、ウサギ alveolar macrophage 及び血清中に含

表1 V.C. ウサギ Alveolar macrophage 抽出液の Sephadex G-200
 劃分によるツベルクリン感受性の伝達実験

分 劃	処 理 法	細胞 相当 量 ml	蛋 白 量 mg	Recipient のツベルクリン反応 (1:10 O.T. 発赤径 mm)												
				静 脈 内 投 与 後 の 日 数												
				直 後			1 日			3 日			7 日			
				時間 5	24	48	5	24	48	5	24	48	5	24	48	
FC ₁	4°C, 24時間 PBS-EDTA に対して透析	3.0	4.6	—	—	±	(20×20)	±	±	±	—	—	—	—	—	—
FC ₁		7.5	10.2	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—
FC ₁		10.0	15.7	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—
FC ₂	同 上	3.0	21.0	—	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FC ₂		5.0	30.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
FC ₂		10.0	60.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
FC ₃	Sephadex G-25			—	—	—	—	⁺ (14×14)	±	±	⁺ (22×24)	⁺ (20×19)	—	⁺ (22×20)	±	—
	{PC ₁ PC ₂ }	1.5	1.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FC ₃	〃	{PC ₁ PC ₂ }	5.0	5.2	—	—	—	⁺ (23×23)	⁺ (15×16)	±	—	⁺ (21×12)	⁺ (18×16)	—	±	±
				—	—	—	—	—	—	—	—	⁺ (20×18)	±	—	—	—
FC ₃	〃	PC ₁	7.5	7.8	—	—	±	±	⁺ (16×16)	±	—	⁺ (18×16)	⁺ (14×14)	—	—	—
FC ₄	Sephadex G-25 にて脱塩	3.0		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—
FC ₄		5.0		—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FC ₄		7.5		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

有されるリゾチーム様物質が、その分子量、生物学的活性に於て卵白リゾチームに類似していることを報告した。従って、FC₃ は albumin (分子量約 70,000) とリゾチーム (分子量約 15,000) との間に位する分子量を有するものとみることが出来る。FC₄ は著明な紫外線吸収性を有し、然も 280m μ におけるよりも 260m μ における吸収が強いことより、蛋白質のみより構成される分劃とは考え難く、蛋白質以外の物質が多量混在しているものと思われた。細胞抽出液を実験方法の項で記述した方法で蒸溜水に対して透析し、その内液上清を同一 Sephadex G-200 カラムで gel filtration technique により分劃した場合、FC₄ が著明に減少していることが認められた。従って、FC₄ はセロファン膜を容易に通過しうる程度の小さい分子量を有する物質より成るものと考えられた。又リゾチーム活性は、透析前に比し透析後には、外液にその30%が存在していた。従って、FC₃ もその一部は透析外液に移行しうるものである。

表1に示した如く、FC₁、FC₂、及びFC₄の3分劃はツベルクリン感受性伝達能を欠き、FC₃にのみ伝達能を証明した。然もFC₃をSephadex G-25により細分劃した結果、PC₁及びPC₂の2分劃を得たが、PC₁に明瞭な伝達能を認めたと反して、PC₂では活性が比較的微弱であった。以上の予備実験を行った後、更にFC₃によるツベルクリン感受性伝達実験の再現性について検討を加えた。即ち、表2に示す如く6回に亘って同じ実験を反復し、その内5回に就て明瞭に陽性の成績を得た。この成績はFC₃を24時間、4°Cで蒸溜水に対して透析した後も、その内液上清には尚充分な伝達能が存在することを示すものであり、Sephadex G-25で処理して得たPC₁の場合よりも、recipientの皮膚反応、特に硬結が明瞭であった。対照として用いられた0.15M NaCl液静注群、及びPBS-EDTA静注群では、全く反応は陰性であったので、recipientにおけるO.T.反復テストの影響は、この実験に関する限り皆無と考えられる。従っ

表2 V.C. ウサギ Alveolar macrophage 抽出液の FC₃ による伝達実験と対照実験成績

[illegible]

て、FC₃ 静注後 1 日目～3 日目に recipient が明瞭にツベルクリン感受性を獲得したことは、FC₃ の移入に起因するものと判定して差支えないと思われる。更に注目すべきことは、伝達されたツベルクリン感受性が 3 日目に最高となり、7 日目には既に減弱していることで、明かに受働感作であると考えられる。

第2節 電気泳動による分割実験：

結核菌による感作及び challenge を行った alveolar macrophage 抽出液を電気泳動によ

り分割し、これら各分割についてツベルクリン感受性の受身伝達実験を行った。第1図に示す如く、細胞抽出液を澱粉カラム上で電気泳動することにより、陽極側より陰極側に向って順次A、B及びCの3分割を得た。

各分劃を 夫々正常 ウサギの 耳静脈に注射した
後、 ツベルクリン皮内反応を直後、 1 日目、 3
日目、 7 日目及び21日目の 5 回にわたって追跡
した結果、 表 3 に示す様な実験成績を得た。即
ち、 別々の材料について、 各々 1 回づつ計 2 回

表3 V.C. ウサギ Alveolar macrophage 抽出液の澱粉カラム
分域電気泳動による分割の伝達実験

分 割	投 与 量 Packed cell 相当量	Recipient のツベルクリン反応 (1:10 O.T. 発赤径 mm)												
		静 脈 内 投 与 後 の 日 数												
		直 後			1 日			3 日			7 日			
		時間 5	24	48	5	24	48	5	24	48	5	24	48	
A	10	ml	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—
B		—	—	—	—	—	—	—	—	(25×20)	(22×20)	—	—	—
C		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A	10		—	—	—	—	—	±	—	+	+	—	—	—
B		—	—	—	—	—	—	—	—	(19×17)	(14×13)	—	—	—
C		—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	±	—	—

の実験を行った結果、何れの場合も A 分割を注射した recipient の皮内反応は注射後 3 日目に陽性となったが、7 日目には再び陰性となった。一方、B 及び C の両分割を注射した recipient の皮内反応は注射後 7 日目迄は全く陰性であった。即ち、本 Transfer factor は電気泳動によって陽極側に移動することが明かとなった。A 分割は α -globulin 分割に相当する分割であるので、本 Transfer factor も α -globulin 分割に含まれると考えてよからう。尚、リゾチーム

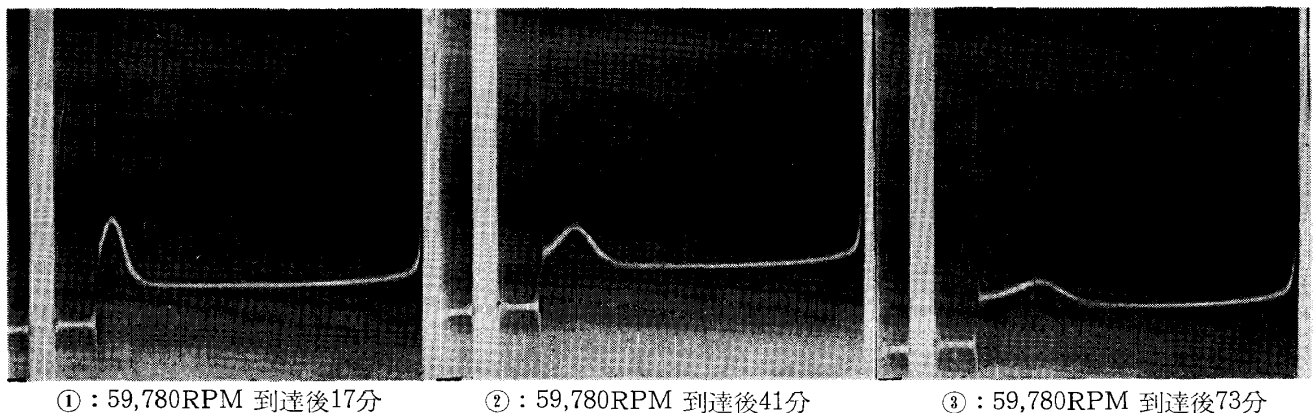
活性は陰極側、即ち γ -globulin の位置に検出され、 α -globulin 領域には認められなかった。次にセルローズアセテートを支持体とする電気泳動を FC_3 について行った結果、ボンソー -3R に染色する蛋白が α -globulin 分割に一致する位置に認められた。従って、 FC_3 がその成分として α -globulin を含有することは明かである。

第3節 Transfer factor の性状：

1) 超遠心分析による沈降係数の測定

Transfer factor を含む活性分割 FC_3 の沈 *

図5 V.C. ウサギ Alveolar macrophage 抽出液分割 FC_3 のシュリーレン沈降図形



*降係数を超遠心分離器を用いて測定し、併せて分割の純度の検定を行った。本分割は既述した如く、Sephadex G-200 gel filtration 及び透析によって、或程度迄精製されている故、この沈降係数を測定することによって、Transfer factor の分子量を推定出来ると考えた。第5図にそのシュリーレン沈降図形を示した。一つのピークが認められ、 $S_{20, w}$ は 3.2S と計算された。

2) 細胞抽出液 RNA 分割による受身伝達実験：

細胞抽出液より Kirby の方法で RNA 分割を作製し、これによるツベルクリン感受性の受身伝達実験を試みた。その実験成績は表4の如く、総て陰性であり、Transfer factor はこの分割中には存在しないと思われた。

3) 透析外液による受身伝達実験：

Lawrence (7) 及び Baram ら(21)はヒトの白血球破碎液の透析外液中にも Transfer factor が存在すると主張しているが、この実験成績と比較する目的でウサギの細胞抽出液の透析外液を

用いて、ツベルクリン感受性の受身伝達実験を試みた。この実験成績は表4の如く、7.5ml という多量の細胞に相当する実験材料を使用したにも拘らず、総て陰性であった。即ち、著者の実験成績では透析外液中に Transfer factor が存在するという明瞭な証拠を得ることが出来なかったが、この点は Inhibitor の存在を考慮して再検討する必要がある。

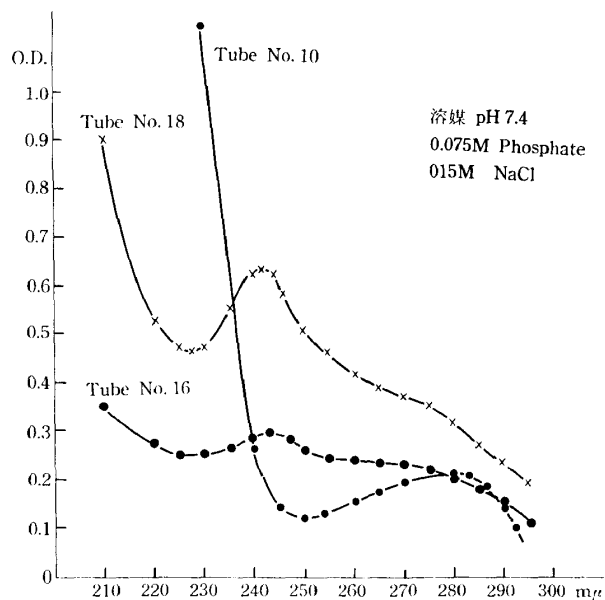
4) 紫外線吸収の特異性：

図6は FC_3 の Sephadex G-25 による細分割(図3)における紫外線吸収曲線である。Tube No. で示した各溶出部の特異的吸収は、 PC_1 に属する Tube No. 10 では $280m\mu$ にて最大となり、 PC_2 に含まれる Tube No. 16 及び18では $243m\mu$ にて最大となるピークを示した。Baram ら(21)は、ヒトの末梢血白血球の破碎抽出液を透析し、その透析外液濃縮材料を用いてツベルクリン感受性の受身伝達に成功したが、この材料の紫外線吸収の最大は $245m\mu$ 附近にあり、上記 PC_2 分割の吸収と全く同様のパターンであ

表4 細胞抽出液より Kirby の方法で採取した RNA 割分及び細胞抽出液の透析外液割分の伝達実験成績

分 割	Orcinol 反応により測定した Ribose 相当量 μg	細胞相当量 ml	Recipient のツベルクリン反応 (1:10 O.T. 発赤径 mm)											
			静脈内投与後の日数											
			直 後			1 日			3 日			7 日		
			時間 5	24	48	5	24	48	5	24	48	5	24	48
RNA	500	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
RNA	500	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
細胞抽出液の蒸留水に対する 4°C, 48時間透析外液 同 上		7.5	—	—	±	±	±	±	—	—	—	—	—	—
		7.5	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—

図6 FC₃ の Sephadex G-25 による細分割 (図3) における紫外線吸収曲線



った。本実験では既述の如く、PC₁、PC₂ 共に伝達能を示したが、PC₁ の活性が特に高かった。然して、PC₁ は 243 $m\mu$ での吸収ピークを示さないことより、243 $m\mu$ における吸収は、Transfer factor の本質ではあるまいと思われる。Tube No. 10 の吸収は、280 $m\mu$ で最大を示すが、その吸収分布曲線からして蛋白以外の物質、もしくは蛋白との complex を形成する物質の混在を示すものと思われる。

考 按

BCG 死菌感作後 challenge 処理を加えたウ

サギの alveolar macrophage 抽出液に、ツベルクリン感受性伝達因子 (Transfer factor) が存在することを確認した。本実験の成功も、細胞抽出液の gel filtration, 電気泳動による分割を行った結果、inhibitor を除去し得たためであろうと思われ、先に報告された inhibitor の概念の合理性(9)を再確認した。

Sephadex G-200 gel filtration による分割操作の結果、Transfer factor は分子量にして albumin とリゾチームの中間にあり、超遠心分析では 3.2S 程度の沈降係数を有するものであった。分子量から推測しても、“conventional antibody” とは相異しており、むしろ、Porter (22) が報告した抗体フラグメントに相当する大いさと思われる。先に、Baram ら(20)は、ヒト白血球における Transfer factor の本態を推測して、次の三つの可能性を列挙し検討した。即ち、①、白血球中に微量の Mycobacterium antigen が存在し、これが recipient を能動的に感作するか、或いは anamnestic response を惹起させるもの。②、recipient 細胞に感作の情報を伝える核酸又は核酸系物質。③抗体分子の sub-unit である可能性。これらの考察は、本実験に於ても検討されねばならぬ諸点である。第一に、antigen が alveolar macrophage 抽出液中に混在し、FC₃ に含まれてくる可能性については、次の二点からの検討が可能である。即ち、FC₃ により伝達された感受性が投与後 1～3 日

目に始まり、7日目には既に減弱乃至は消失することは、能動感作が通常7日以後に出現することと較べて、時間的推移からも受身感作であることを示している。更に、細胞抽出液分割を感受性の強いモルモットに投与しても感作されなかった(2)事より、単なる antigen であるとは思われない。第二に、核酸系物質である可能性については、本実験で細胞抽出液より RNA 劃分を抽出し、recipient に投与した結果、何等の伝達活性をも認めることが出来ず、少なくとも、かかる方法で得た RNA 劃分には活性のないことが明かであった。Lawrence(6)は、ヒト白血球抽出液中に含まれる Transfer factor は、DNAse, RNAse の処理にも失活しないと報告したが、本実験の結果もこの所見と一致するものである。

今回の実験結果からすれば、第3の推論、即ち Transfer factor は抗体分子の sub-unit、或は antibody precursor 又はフラグメントであるという推定に最も重点をおきたいと考える。勿論この推論の妥当性は今後の検索によって吟味されねばならないが、一応抗体のフラグメントであるという仮設は魅力ある研究テーマとなろう。

総 括

BCG 死菌感作後 challenge を行ったウサギの alveolar macrophage を冷凍融解操作により破壊し、抽出液を作製した。gel filtration 或いは分域電気泳動によって、抽出液を分割し、これらの分割を用いてツベルクリン感受性の受身伝達実験を行い、Transfer factor の性状について研究した。

1) Sephadex G-200 及び G-25 を用いた gel filtration による分割実験の結果、FC₃ の細分割 PC₁ に最も明瞭な Transfer factor としての活性を認めた。この実験成績より Transfer factor の分子量は albumin より小さく、リゾチームより大きいものと推定された。

2) 細胞抽出液の透析外液(48時間、4°C、蒸溜水に対して透析)そのままでは、伝達活性を認めることは出来なかった。

3) 澱粉カラムによる電気泳動分割による実験結果、Transfer factor は陽極側に移動する分割に含まれており、α-globulin 分割に属する物質であった。一方、gel filtration より得た FC₃ のセルローズアセテート電気泳動の結果からも、α-globulin の存在が確認された。

4) FC₃ のスピニコ E による超遠心分析の結果では Transfer factor は沈降係数 3.2S の分割にあった。従って Transfer factor は“conventional antibody”とはその分子量に於て異なるものである。

5) 細胞抽出液より作製した RNA 劃分には、ツベルクリン感受性の伝達能は認められなかった。

6) FC₃ の活性細分割 PC₁ は紫外線吸収を有し、280mμ で最大を示した。

7) 以上の実験結果を基にして、Transfer factor の本態について考察を加えた。

謝辞：稿を終るに臨み、本研究の指導を賜った辻周介教授、大島駿作助教授、並びに御協力いただいた泉孝英博士に深く感謝致します。

又、実験遂行の上に御協力いただいた木津啓氏、神田郁子氏、小原保代氏、和田ひな氏に感謝致します。

文 献

- 1) Chase, M. W. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 59 : 134, 1945
- 2) Landsteiner, K. and Chase, M. W. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 49 : 688, 1942
- 3) Lawrence, H. S. : J. Immunol., 68 : 159, 1952
- 4) Arnason, B. G. and Waksman, B. H. : Advances in tuberculosis research. Edited by H. Birkhäuser, H. Bloch and G. Canetti. : P. 11, New York, S. Karger, 1964
- 5) Lawrence, H. S. : J. Clin. Invest., 34 : 219, 1955
- 6) Lawrence, H. S. : Cellular and Humoral Aspects of Hypersensitive States, Edited by H. S. Lawrence, P. 293, Paul B. Hoeber Inc., New York, 1959
- 7) Lawrence, H. S. and AL-Askari, S., David, J., Franklin, E. C., and Zweiman, B. :

- Transactions of the Association of American Physicians, 76 : 84, 1963
- 8) Baram, P. and Mosko, M.M. : J. Allergy, 33 : 498, 1962
- 9) Tsuji, S., Oshima, S., Oshiro, M., and Izumi, T., J. Immunol., 93 : 838, 1964
- 10) Myrvik, Q.N., Soto-Leake, E. and Fariss, E.: J. Immunol., 86 : 133, 1961
- 11) Kunkel, H.G. : Methods of Biochemical Analysis, 1 : 141, 1954
- 12) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis, F.A., and Randall, R.J. : J. Biol. Chem., 193 : 265, 1951
- 13) Kirby, K.S., : Biochem. J., 64 : 405, 1956
- 14) Volkin, E. and Cohn, W.E. : Methods of Biochemical Analysis, 1 : 287, 1954
- 15) 川出由己 : 生物物理化学実験法. 渡辺格, 島内武彦共編, : P. 1, 培風館, 1962
- 16) 大島駿作, Myrvik, Q.N., Soto-Leake E. : 京結紀要, 9 : 154, 1961
- 17) 小川恕人 : Metabolism and Disease, 2 : No. 6, 74, 1965
- 18) Flodin, P., Killander, J. : Biochim. Biophys. Acta, 63:403, 1962
- 19) Myrvik, Q.N. and Weiser, R.S. : Am. Rev. Tuberc., 64 : 669, 1951
- 20) Myrvik, Q.N., Leake, E.S., Oshima, S. : J. Immunol., 89 : 745, 1962
- 21) Baram, P. and Mosko, M.M. : Immunology, 8 : 461, 1965
- 22) Porter, R.R.: Nature, 182, 670, 1958
- 23) 泉孝英 : アレルギー, 13 : 583, 1964